

10/518801

DT09 Rec'd PCT/PTO 16 DEC 2004

Docket No.: 04703/0202222-US0
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Naoyuki Yamamoto et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Confirmation No.: N/A

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: N/A

For: ANTIALLERGIC AGENT, UTILIZATION
THEREOF FOR REDUCING ALLERGY AND
METHOD OF REDUCING ALLERGY

Examiner: Not Yet Assigned

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

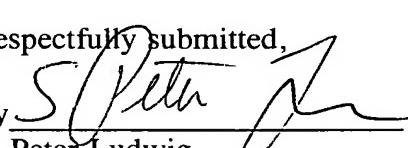
Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

Country	Application No.	Date
Japan	2002-185897	June 26, 2002

A certified copy of the aforesaid Japanese Patent Application was received by the International Bureau on August 8, 2003 during the pendency of International Application No. PCT/JP03/08094. A copy of Form PCT/IB/304 is enclosed.

Dated: December 16, 2004

Respectfully submitted,

By 
S. Peter Ludwig
Registration No.: 25,351
(212) 527-7700
(212) 753-6237 (Fax)
Attorneys/Agents For Applicant

BEST AVAILABLE COPY

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

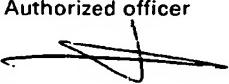
SAKAI, Hajime
Shuwa Kioicho TBR Building
7, Kojimachi 5-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083
Japan



Date of mailing (day/month/year) 20 August 2003 (20.08.03)	IMPORTANT NOTIFICATION		
Applicant's or agent's file reference 4993			
International application No. PCT/JP03/08094	International filing date (day/month/year) 26 June 2003 (26.06.03)		
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 26 June 2002 (26.06.02)		
Applicant CALPIS CO., LTD. et al			

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
26 June 2002 (26.06.02)	2002-185897	JP	08 Augu 2003 (08.08.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.70.10	Authorized officer  David GEVAUX (Fax 338 7010) Telephone No. (41-22) 338 8778
--	---

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 6月26日

REC'D 08 AUG 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-185897

WIPO Best

[ST.10/C]:

[JP2002-185897]

出願人

Applicant(s):

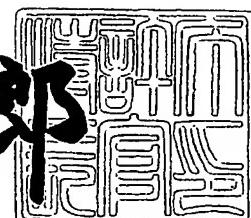
カルピス株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3052437

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P02-144
 【提出日】 平成14年 6月26日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピ
 ス株式会社基盤技術研究所内
 【氏名】 山本 直之
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピ
 ス株式会社基盤技術研究所内
 【氏名】 石田 優
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピ
 ス株式会社基盤技術研究所内
 【氏名】 坂東 出樹
 【特許出願人】
 【識別番号】 000104353
 【氏名又は名称】 カルピス株式会社
 【代理人】
 【識別番号】 100081514
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 酒井 一
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100082692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 蔵合 正博
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 007010

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0014648

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗アレルギー剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤。

【請求項2】 前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラスCP1613株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-14204）、L92株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-14205）またはこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである請求項1記載の抗アレルギー剤

【請求項3】 前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-18866）である請求項1記載の抗アレルギー剤。

【請求項4】 持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少させることを特徴とする請求項1記載の抗アレルギー剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、抗アレルギー剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

わが国のアレルギー患者は年々増加しており、成人の3人に1人は何らかのアレルギー疾患であるといわれている。アレルギー疾患は作用機序によりI型～IV型と大きく4タイプに分類されている。花粉症などのアレルギー性鼻炎や、気管支喘息、アトピー性皮膚炎の一部は、免疫グロブリンE（IgE）依存性のI型アレルギーといわれるものであり、血中の抗原特異的IgE抗体が増加するとアレルギー

症状を引き起こすリスクが高くなる。

【0003】

I型アレルギーの発症機構について述べる。体内に侵入した花粉やハウスダスト、ダニなどの抗原に対する特異的IgE抗体が産生され、マスト細胞や血中の好塩基球表面のFc ϵ レセプターに結合することで感作された状態となる。その後さらに抗原が体内に侵入すると、抗原がIgE抗体に結合し、複合体が形成されることで脱顆粒を引き起こし、顆粒中のヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質が放出され、これらの作用によりアレルギー症状が現れる。

【0004】

今日アレルギー疾患の治療に主に用いられているのは、抗ヒスタミン剤に代表される化学伝達物質の拮抗剤と、抗炎症剤として用いられるステロイド剤である。しかしいずれも対症療法にすぎず、ステロイド剤については免疫反応全体を抑制してしまうために副作用が伴う。また脱顆粒抑制による化学伝達物質遊離抑制剤も用いられているが、発症の主な因子であるIgE抗体を特異的に減少させるような根本的な治療薬は現在のところない。

【0005】

また、抗アレルギー剤は、長期間連用する必要が生じるので、容易に摂取でき、且つ安全性が高いものが望まれる。従って、そのような特性を有しうる新たな抗アレルギー剤が求められている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、I型アレルギーの発症に関わるIgE抗体量を減少させてアレルギー体質を改善することができ、容易に摂取でき、かつ安全性が高い抗アレルギー剤を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本願発明者らは、大きなIgGの増加を伴わず、顕著に抗原特異的IgEが増加したマウスモデルを構築し、そのモデルにおいて、腸管免疫系に影響を及ぼしうる各種の乳酸菌菌株のIgE量抑制作用を検討したこと

ろ、各種の乳酸菌のうち特定のものが、特に優れたIgE産生抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0008】

即ち、本発明によれば、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤が提供される。

【0009】

また、本発明によれば、前記ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌がラクトバチルス・アシドフィラスCP1613株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-14204）、L92株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-14205）及びこれらの組み合わせからなる群より選択されるものである前記抗アレルギー剤が提供される。

【0010】

さらに、本発明によれば、前記ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌がラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-18866）である前記抗アレルギー剤が提供される。

【0011】

さらに、本発明によれば、持続的に鼻部に抗原刺激をすることにより血中の抗原特異的IgE抗体を増加させた鼻炎モデルマウスにおいて、経口投与により血中の抗原特異的IgE抗体を減少させることを特徴とする前記抗アレルギー剤が提供される。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の抗アレルギー剤は、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む。

【0013】

ラクトバチルス・アシドフィラスに属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィラスCP1613株（特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6）寄託番号FERM P-14204、寄託日1994年3月4日）、L92株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-14205、寄託日1994年3月4日）又はこれらの組み合わせが特に好ましい。また、ラクトバチルス・ファーメンタムに属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・ファーメンタムCP34株（特許生物寄託センター寄託番号FERM P-18866、寄託日2002年5月23日）が特に好ましい。

【0014】

ラクトバチルス・アシドフィラスCP1613株は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

1) 細胞の形：桿菌、2) 運動性の有無：無、3) 孢子の有無：無、4) グラム染色：陽性

(生理学的性質)

1) カタラーゼ：陰性、2) インドールの生成：陰性、3) 硝酸塩の還元：陰性、4) 酸素に対する態度：通性嫌気性、5) 15℃で生育：無、6) グルコースからホモ乳酸発酵によりDL乳酸生成、ガス產生無

7) 各種糖類から酸生成の有無

グルコース	+	メリビオース	+
ラクトース	+	ラフィノース	+
マンノース	+	マンニトール	-
フラクトース	+	ソルビトール	-
ガラクトース	+	エスクリン	+
シュークロース	+	サリシン	+
アラビノース	-	N-アセチルグルコサミン	+
マルトース	+	アミグダリン	+
キシロース	-	ゲンチオビオース	+
ラムノース	-	メレチトース	-
セロビオース	+	デキストリン	+
トレハロース	+	スターチ	-

【0015】

ラクトバチルス・アシドフィラスL92株は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

- 1) 細胞の形：桿菌、 2) 運動性の有無：無、 3) 胞子の有無：無、 4) グラム染色：陽性

(生理学的性質)

- 1) カタラーゼ：陰性、 2) インドールの生成：陰性、 3) 硝酸塩の還元：陰性、 4) 酸素に対する態度：通性嫌気性、 5) 15℃で生育：無、 6) グルコースからホモ乳酸発酵によりD,L乳酸生成、ガス產生無

7) 各種糖類から酸生成の有無

グルコース	+	メリピオース	-
ラクトース	+	ラフィノース	+
マンノース	+	マンニトール	-
フラクトース	+	ソルビトール	-
ガラクトース	+	エスクリン	+
シュークロース	+	サリシン	+
アラビノース	-	N-アセチルグルコサミン	+
マルトース	+	アミグダリン	+
キシロース	-	ゲンチオビオース	+
ラムノース	-	メレチトース	-
セロビオース	+	デキストリン	-
トレハロース	+	スターチ	-。

【0016】

ラクトバチルス・ファーメンタムCP34は、以下の菌学的性質を有する。

(形態学的性質)

- 1) 細胞の形：桿菌、 2) 運動性の有無：無、 3) 胞子の有無：無、 4) グラム染色：陽性

(生理学的性質)

- 1) カタラーゼ：陰性、 2) 酸素に対する態度：通性嫌気性、 3) グルコースか

らDL乳酸生成し、ガス產生(+)。

4) 各種炭水化物の分解性

アラビノース	-	セロビオース	-
キシロース	-	ラクトース	+
メリビオース	-	トレハロース	-
ラムノース	-	アミグダリン	-
リボース	+	ラフィノース	-
グルコース	+	メレチトース	-
マンノース	-	マンニトール	-
フラクトース	+	ソルビトール	-
シュークロース	+	エスクリン	-
マルトース	+	サリシン	-

【0017】

本発明の抗アレルギー剤中の、前記乳酸菌の含有割合は、特に限定されず製造の容易性や好ましい一日投与量等に応じて適宜調節しうるが、例えば剤型が液体の場合 $1\times10^7\text{ cells}/\text{ml}\sim1\times10^{10}\text{ cells}/\text{ml}$ とすることが好ましい。

【0018】

本発明の抗アレルギー剤は、前記乳酸菌に加え、他の成分を含むことができる。他の成分としては、賦形剤等の添加剤、及び後述する培地の成分等を挙げることができる。

【0019】

本発明の抗アレルギー剤は、前記乳酸菌を培地において培養することにより製造することができる。

【0020】

培養に用いる培地は、前記乳酸菌が生育可能な培地であればどのようなものでも利用可能であり、獣乳、脱脂乳、乳性ホエー、MRS培地、GAM培地、BL培地、Briggs Liver Brothや合成培地などを用いることができる。培養温度は25°Cから50°C、好ましくは35°Cから42°Cとすることができる。また、培養時間は3時間から48時間、好ましくは8時間から12時間とすることができる。培養終了後の培地をそ

のまま、又は必要に応じてさらに処理することにより本発明の抗アレルギー剤とすることができる。例えば、培養終了後の培地から遠心分離、ろ過等により集菌して菌体のみとしたもの、これを凍結乾燥菌体としたもの、さらに加熱処理した菌体、菌体破碎物等も本発明の抗アレルギー剤とすることができる。また、上記のものをさらに製剤化したものや、飲料、錠菓、ペースト、パンなど様々な食品素材に配合したもの等も、本発明の抗アレルギー剤とすることができる。

【0021】

本発明の抗アレルギー剤の投与方法は、特に限定されないが経口投与が好ましい。投与量は、例えばヒトへの経口投与の場合、菌体数として 2×10^9 個／日以上、好ましくは 2×10^{10} 個／日とすることができます、1日1回投与、または複数回の分与とすることもできる。

【0022】

本発明の抗アレルギー剤は、後述する実施例において確認されるとおりIgE抗体量を効果的に抑制することができる一方、食品として摂食されている菌体を有効成分とするため、安全性は高いものと思われる。

【0023】

【発明の効果】

本発明の抗アレルギー剤は、生体中のIgE抗体量を効果的に減少させることができ一方、容易に摂取でき、且つ安全性が高い。したがって、IgE抗体量の過剰が関与するアレルギーの抑制に有用である。

【0024】

【実施例】

以下に本発明を実施例を参照してより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0025】

【実施例1】

(高IgEマウスの作成)

BALB/c系雄マウスを日本チャールスリバー社から購入し、飼料としてCE-2(日本クレア社製)を自由摂取させ飼育した。卵白アルブミン(以下、OVAと略す

。シグマ社製) 10 μg 及びアジュvantとして水酸化アルミニウム(和光純薬株式会社製) 2mgを生理食塩水300 μl に懸濁した。この懸濁液を、6週齢の上記マウス10匹のそれぞれに、感作開始日及び4日目に腹腔内投与し、一次感作を行った。二次感作として、OVAが25mg/ ml となるよう生理食塩水に溶解したOVA抗原溶液にマウスの鼻を約3秒間浸した。この操作を1回につき3度繰り返し、1日に2回行った。これを10~16日目まで毎日行ない、高IgEマウスを得た。

【0026】

この高IgEマウスの眼底静脈より、感作開始日及び17日目に部分採血し、採取した血液より血清サンプルを得た。この血清サンプル中の、OVA特異的IgE(以下、OVA-IgEと略す)、総IgE及び総IgGを、下記の測定方法により測定した。結果を図1(a)~図1(c)に示す。

【0027】

図1(a)~1(c)の結果より、感作により血中の総IgE及びOVA-IgEが増加量がIgG増加量に対して著しく大きいことが分かる。このようにして、免疫機能を全体的に変動させることなく、血中IgE及び抗原特異的血中IgEが増加したアレルギーモデルマウスが構築された。

(血中OVA-IgEの測定)

サンドイッチELISA法によって行った。96穴イムノプレート(コーニング社製)の各ウェルにヒツジ抗マウスIgEポリクローナル抗体(商品名「AAM11」、大日本製薬株式会社製) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水溶液を100 μl 加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをリン酸緩衝液(137mM NaCl, 2.7mM KC1, 8.1mM Na₂HP0₄及び1.5mM KH₂PO₄を含む。以下PBSと略す。)で3回洗浄した後、0.5%カゼイン含有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。PBSで1/10に希釈した血清サンプル100 μl を各ウェルに加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ビオチン化キット(アメリカン・コレックス社製)でビオチン化したOVA(ビオチンラベルOVA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む0.5%カゼイン含有PBS溶液を各ウェルに100 μl 加えて室温で2時間反応後、PBSで5回洗浄した。ストレプトアビジンペルオキシダーゼ(シグマ社製) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに100 μl 加えて室温で1時間反応させた。

プレートを0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄した後、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)（以下ABTSと略す。ベーリングガーマンハイム社製） $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液（0.2Mクエン酸と0.2Mクエン酸三ナトリウムとを混合してpH5としたもの）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ 加えて37°Cで3時間遮蔽して発色反応した。反応後、OD₄₀₅とOD₄₉₂を測定し、OD₄₀₅値-OD₄₉₂値を用いて真の発色値とした。

【0028】

一方、OVA $25\text{mg}/\text{ml}$ を含む生理食塩水を5回（1回／週）腹腔内投与したマウスの血液を採血し、これから血清を調製し、スタンダード血清とした。このスタンダード血清をPBSで1/10に希釈した。この希釈液をさらに未免疫血清で2倍に希釈する操作を段階的に行い、検量線作成用の希釈液を調製した。これらの希釈液について、上記と同様の操作を行い発色値を測定し、検量線を得た。この検量線に基き、血清サンプル中のOVA-IgE量を、スタンダード血清中のOVA-IgE量を1とした相対量で求めた。

(血中総IgEの測定)

96穴イムノプレート（コーニング社製）の各ウェルにヒツジ抗マウスIgEポリクローナル抗体（商品名「AAM11」、大日本製薬株式会社製） $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水溶液を $50\mu\text{l}$ 加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、0.5%カゼイン含有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。0.5%カゼイン含有PBSで1/25に希釈した血清サンプル $50\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ビオチンラベル抗マウスIgE抗体（ヤマサ醤油株式会社製） $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加えて2時間室温で反応させた。0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄後、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加えて室温で1時間反応させた。プレートを0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄した後、ABTS $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液(pH5)を各ウェルに $50\mu\text{l}$ 加えて、室温で20～30分間遮蔽して反応させ、OD₄₀₅を測定した。

【0029】

一方、血清サンプルの代わりに、マウス抗DNP-IgE（ヤマサ醤油株式会社製）を、カゼイン0.5%を含むPBSに種々の濃度で溶解したものを用いて上記と同様に操作し、検量線を得た。この検量線に基き、血清サンプル中の総IgE量を算出した。

(血中総IgGの測定)

96穴イムノプレート（コーニング社製）の各ウェルにヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体（商品名「62-6500」、ザイメッド社製） $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む生理食塩水溶液を50 μl 加えて、4°Cで一晩インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、0.5%カゼイン含有PBSをウェルいっぱいに加えて、室温で3時間インキュベートし、PBSで3回洗浄した。0.5%カゼイン含有PBSで1/1000に希釈した血清サンプル50 μl を加え、4°Cで一晩反応させた。PBSで4回洗浄し、ペルオキシダーゼラベル抗マウスIgG(γ)抗体（カッペル社製） $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びカゼイン0.5%を含むPBS溶液を各ウェルに50 μl 加えて2時間室温で反応させた。0.1%Tween20含有PBSで5回洗浄後、ABTS 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び過酸化水素0.006%を含む0.2Mクエン酸緩衝液(pH5)を各ウェルに50 μl 加えて、室温で20~30分間遮蔽して反応させ、OD₄₀₅を測定した。

【0030】

一方、血清サンプルの代わりに、精製したマウスIgG（カッペル社製）を、カゼイン0.5%を含むPBSに種々の濃度で溶解したものを用いて上記と同様に操作し、検量線を得た。この検量線に基き、上記血清サンプル中の総IgG量を算出した。

【0031】

【実施例2】

(各種乳酸菌の効果の比較)

表1に示す乳酸菌菌株のそれぞれを、MRS培地で37°Cで一晩前培養し、3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収した。この菌体を、9% (W/V)還元脱脂乳 (0.1% (W/V)酵母エキス(DIFCO社製)を含む)に添加し、37°Cで乳が凝固するまで発酵させ、発酵終了後、各発酵乳の総菌数を測定した。結果を表1に示す。

【0032】

【表1】

株名	総菌数 (cells/ ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスL92(P-14205)	1.9x10 ⁸
ラクトバチルス・ブルガリカスCP1812	1.5x10 ⁸
ラクトバチルス・ファーメンタムCP34	5.3x10 ⁸
ラクトバチルス・ヘルベティカスCP790	2.4x10 ⁸
ラクトバチルス・ジョンソニーCP2551	2.7x10 ⁸
ラクトバチルス・プランタラムCP2172	5.9x10 ⁸
ラクトバチルス・ラムノサスATCC53103	1.0x10 ⁸

【0033】

次に、実施例1と同様の手順で高IgEマウスを作製し、感作18日目に血中OVA-IgEを実施例1と同様の測定方法にて測定した。血中OVA-IgE量が均等になるよう一群10匹ずつにマウスを振り分けた。各群のマウスに、感作19日目～21日目にわたり、上記の各種発酵乳、発酵させていない9% (W/V)還元脱脂乳、又はシクロホスファミドを750 μg含む発酵させていない9w/v%還元脱脂乳を1日につき1 ml、3日間胃ゾンデにより強制投与した。感作開始22日目に、これらのマウスの眼底静脈から採血し、血清を調製し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。また、対照として、同様に感作を行ったが発酵乳等の投与は何も行わなかったマウスについても、同様に採血し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。結果を図2に示す。

【0034】

図2に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラス又はラクトバチルス・ファーメンタム発酵乳を投与した群においては、OVA-IgE量に関して有意な抑制効果が得られた(p<0.01)。一方血中総IgG量に関しては大きな変化は認められなかった。

【0035】

【実施例3】

乳酸菌菌株として表2に示すものを用いた他は、実施例2と同様に操作した。各発酵乳中の総菌数の測定結果を表2に示す。また、血中OVA-IgEの測定結果を

図3に示す。

【0036】

【表2】

株名	総菌数 (cells/ ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスCP1613(P-14204)	4.40x10 ⁸
ラクトバチルス・ガッセリーCP2209	4.30x10 ⁸
ラクトバチルス・ロイテリATCC23272	9.60x10 ⁸
ビフィドバクテリウム・ブレベCP2425	1.30x10 ⁸

【0037】

図3に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラス発酵乳を投与した群においては、OVA-IgE量に関して有意な抑制効果が得られた($p<0.01$)。一方血中総IgG量に関しては大きな変化は認められなかった。

【0038】

【実施例4】

(低用量での効果の確認)

ラクトバチルス・アシドフィラスL92株とラクトバチルス・ファーメンタムCP34株のそれぞれをMRS培地で37°Cで一晩前培養した。3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収してMRS培地に添加し、37°Cで一晩本培養し、再び3000rpmで10分間の遠心分離により菌体を回収した。それぞれ菌数を測定して、1mlあたり 1×10^6 個となるように9%脱脂乳に菌体を懸濁し、懸濁液を調製した。

【0039】

次に、実施例1と同様の手順で高IgEマウスを作製し、感作18日目に血中OVA-IgEを実施例1と同様の測定方法にて測定した。血中OVA-IgE量が均等になるよう一群10匹ずつにマウスを振り分けた。各群のマウスに、感作19日目～21日目にわたり、上記の懸濁液を1日につき1ml、3日間胃ゾンデにより強制投与した。感作開始22日目に、これらのマウスの眼底静脈から採血し、血清を調製し、血中OVA-IgE及び総IgG量を測定した。結果を図4に示す。

【0040】

図4に示される通り、ラクトバチルス・アシドフィラスL92株及びラクトバチルス・ファーメンタムCP34株のいずれを投与した群においても、OVA-IgE量に関して有意な抑制効果が得られた。一方血中総IgG量に関しては大きな変化は認められなかった。

【0041】

発酵させていない脱脂乳を試料とした際のOVA-IgE量のスタンダード比をa、各懸濁液を試料とした際のOVA-IgEのスタンダード比をbとすると、各懸濁液中を投与した場合のOVA-IgEの減少率dは、式 $d=1-(b/a)$ により求められる。投与した懸濁液中の菌濃度をs(cells/ml)とし、sと減少率dとが比例すると仮定すると、この実験系においてOVA-IgEを半減させるのに必要な懸濁液中の菌数x(cells/ml)は、式 $x=(s \times 0.5)/d$ で求められる。この式に基いて、実施例2～3で用いた各菌株における菌数xを求めた。結果を表3に示す。

【0042】

【表3】

株名	必要菌数 (cells/ml)
ラクトバチルス・アシドフィラスL92(P-14205)	1.0×10^6
ラクトバチルス・ブルガリカスCP1812	2.0×10^8
ラクトバチルス・ファーメンタムCP34	1.4×10^6
ラクトバチルス・ヘルペティカスCP790	3.3×10^8
ラクトバチルス・ジョンソニーCP2551	3.5×10^8
ラクトバチルス・プランタラムCP2172	7.0×10^8
ラクトバチルス・ラムノサスATCC53103	2.9×10^8
ラクトバチルス・アシドフィラスCP1613(P-14204)	5.0×10^8
ラクトバチルス・ガッセリーCP2209	3.1×10^9
ラクトバチルス・ロイテリATCC23272	3.3×10^9
ビフィドバクテリウム・ブレベCP2425	1.1×10^9

【0043】

【実施例5】

(ヒト臨床効果)

通年性アレルギー性鼻炎に罹患して症状を呈している13名の被験者（平均年齢 22.9 ± 6.1 歳、男性6名、女性7名）に、2週間の観察期間の後、ラクトバチ

ルス・アシドフィラスL92株を $8.0 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^9$ cell/ml含む発酵乳を100ml/日づつ4週間摂取させた。経時的に自覚症状に関するアンケートをとり、これを元に日本アレルギー学会「アレルギー性鼻炎重症度分類」に従って症状をスコア化した。また、経時的に鼻炎症状を、日本アレルギー学会ガイドラインの基準に従って診断した。また、経時に採血し、血液中のIgE抗体価を測定した。さらに、試験期間中の最低気温を記録した。試験期間中の被験者の鼻閉の重症度、鼻をかんだ回数及び最低気温を図5及び図6に示す。

【0044】

試験期間の最低気温の変化が激しく、摂取期間開始日(11月15日)の14°Cから、摂取期間終了日(12月13日)の3.7°Cまで10°C以上低下し、鼻炎症状は悪化しやすい条件であったにもかかわらず、鼻閉は摂取開始2週間後に改善傾向が見られ(Wilcoxon test: p<0.1)、摂取開始4週間後には有意な改善を認めた(Wilcoxon test: p<0.05)。鼻かみ回数においても摂取開始3週間後に減少傾向が見られた(Wilcoxon test: p<0.1)。また、摂取期間中、くしゃみ回数の減少、下鼻甲介の腫脹の軽快、及び血中総IgE抗体価の低下の傾向が見られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1における、高IgEマウスの血中免疫グロブリン量の変化を示すグラフである。

【図2】

実施例2における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

【図3】

実施例3における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

【図4】

実施例4における、高IgEマウスに対する発酵乳投与によるOVA-IgE量抑制の実験結果を示すグラフである。

【図5】

実施例5における、ヒトに対する発酵乳投与によるアレルギー抑制の実験結果を示すグラフである。

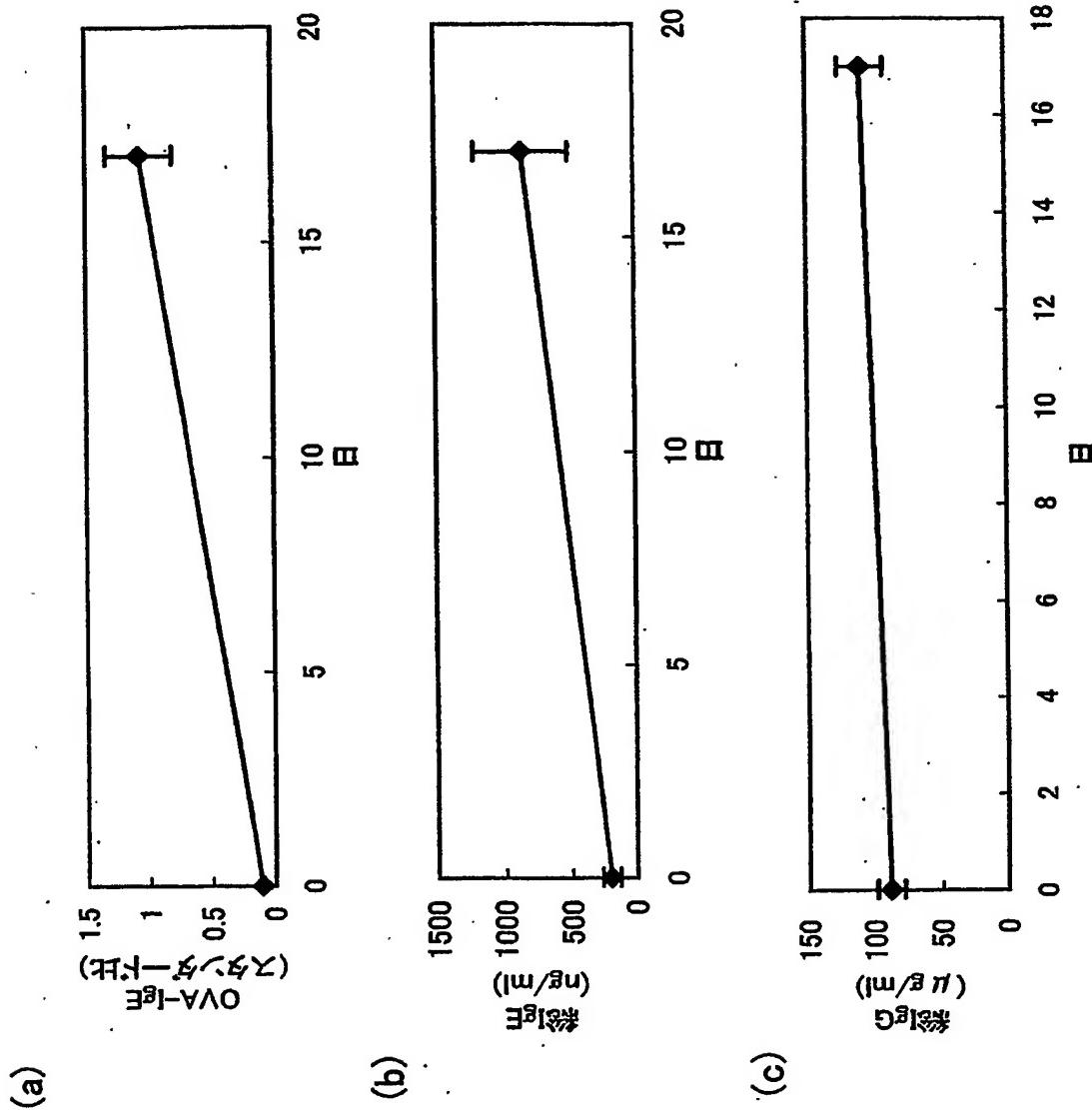
【図6】

実施例5における、ヒトに対する発酵乳投与によるアレルギー抑制の実験結果を示すグラフである。

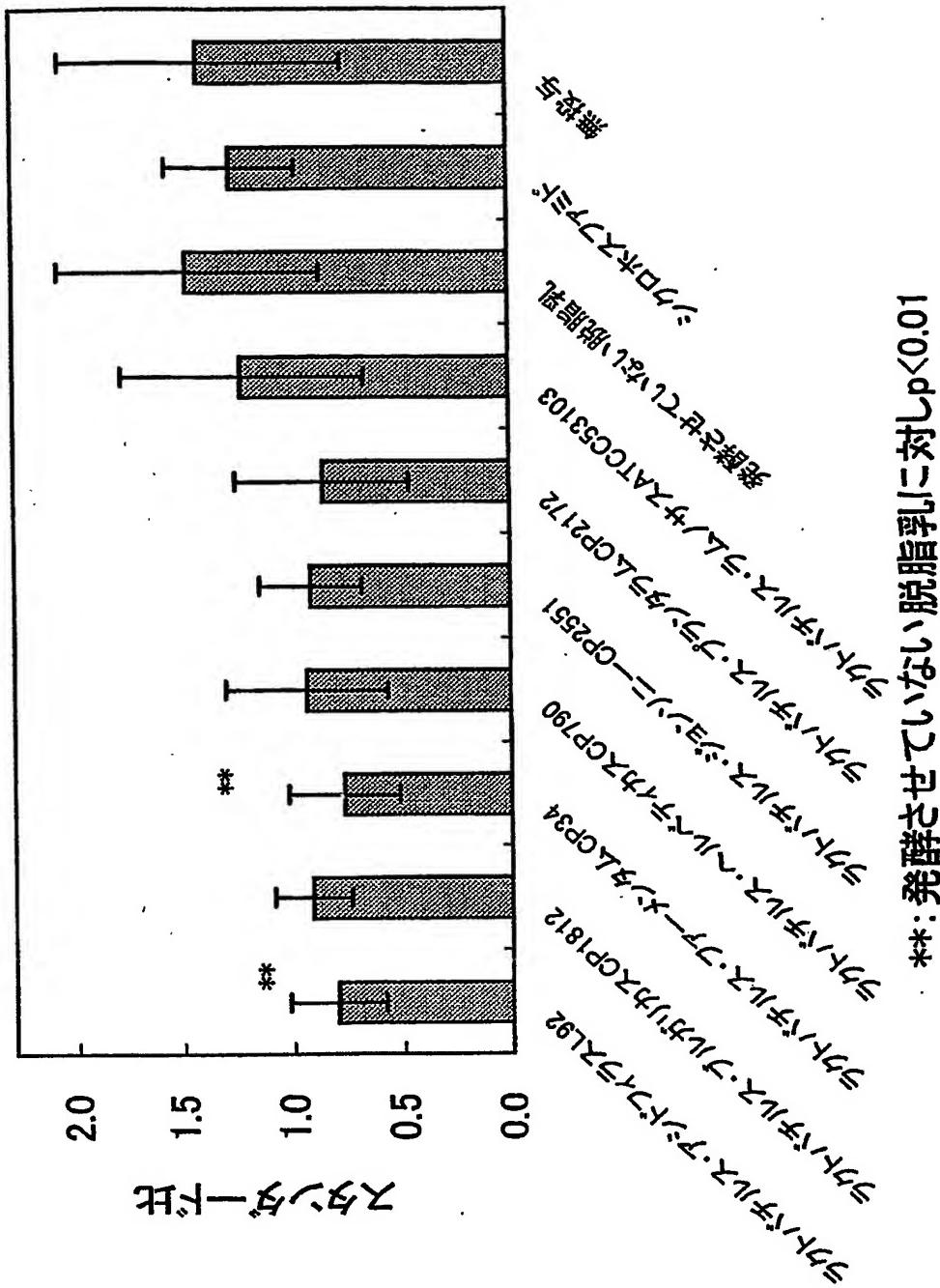
【書類名】

図面

【図1】

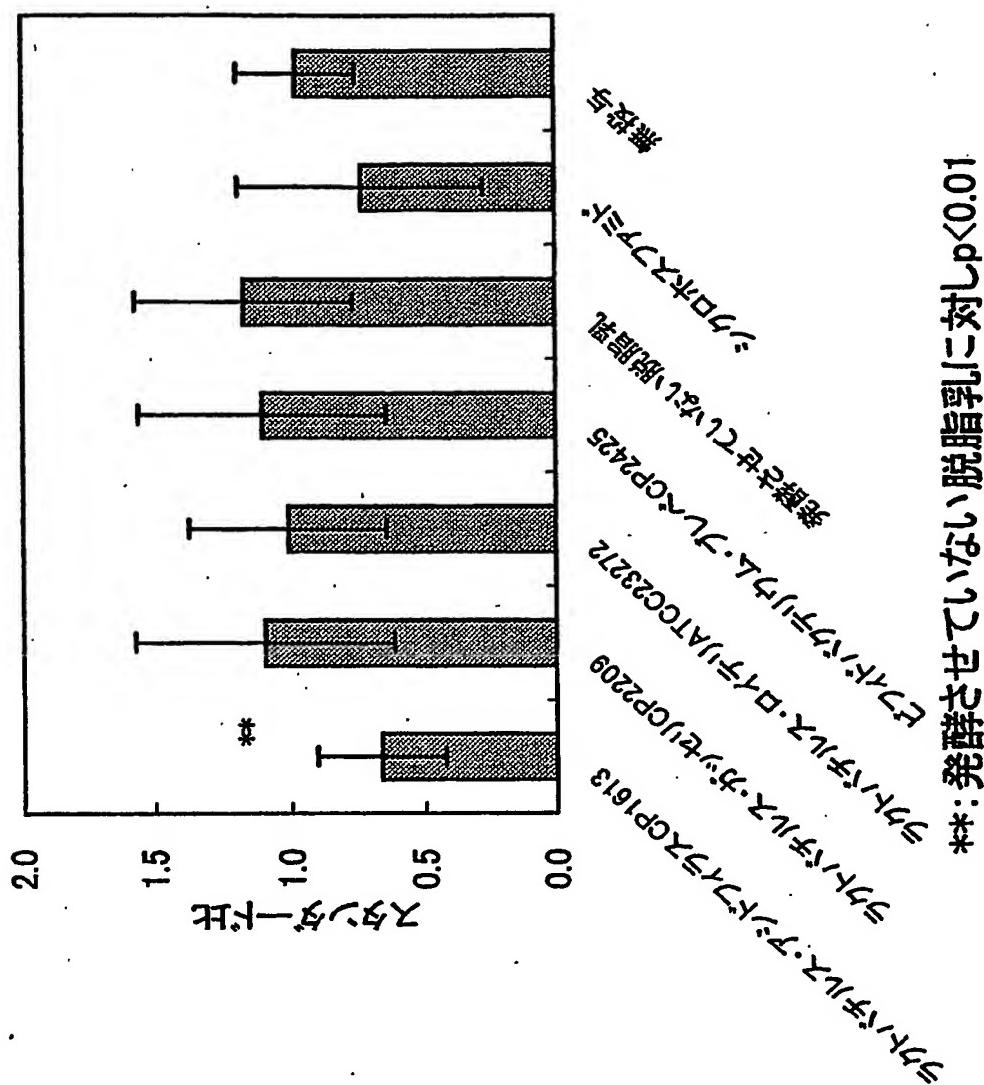


【図2】

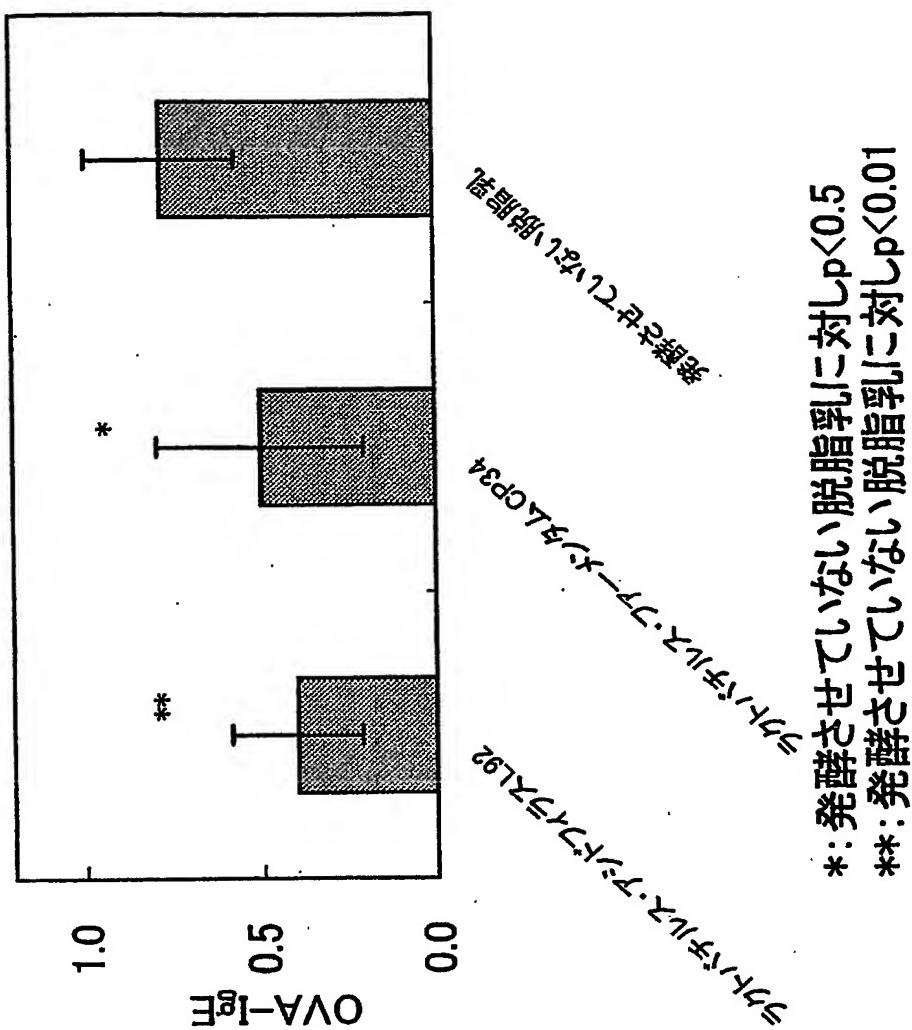


**: 無差別でない脱脂率に対するp < 0.01

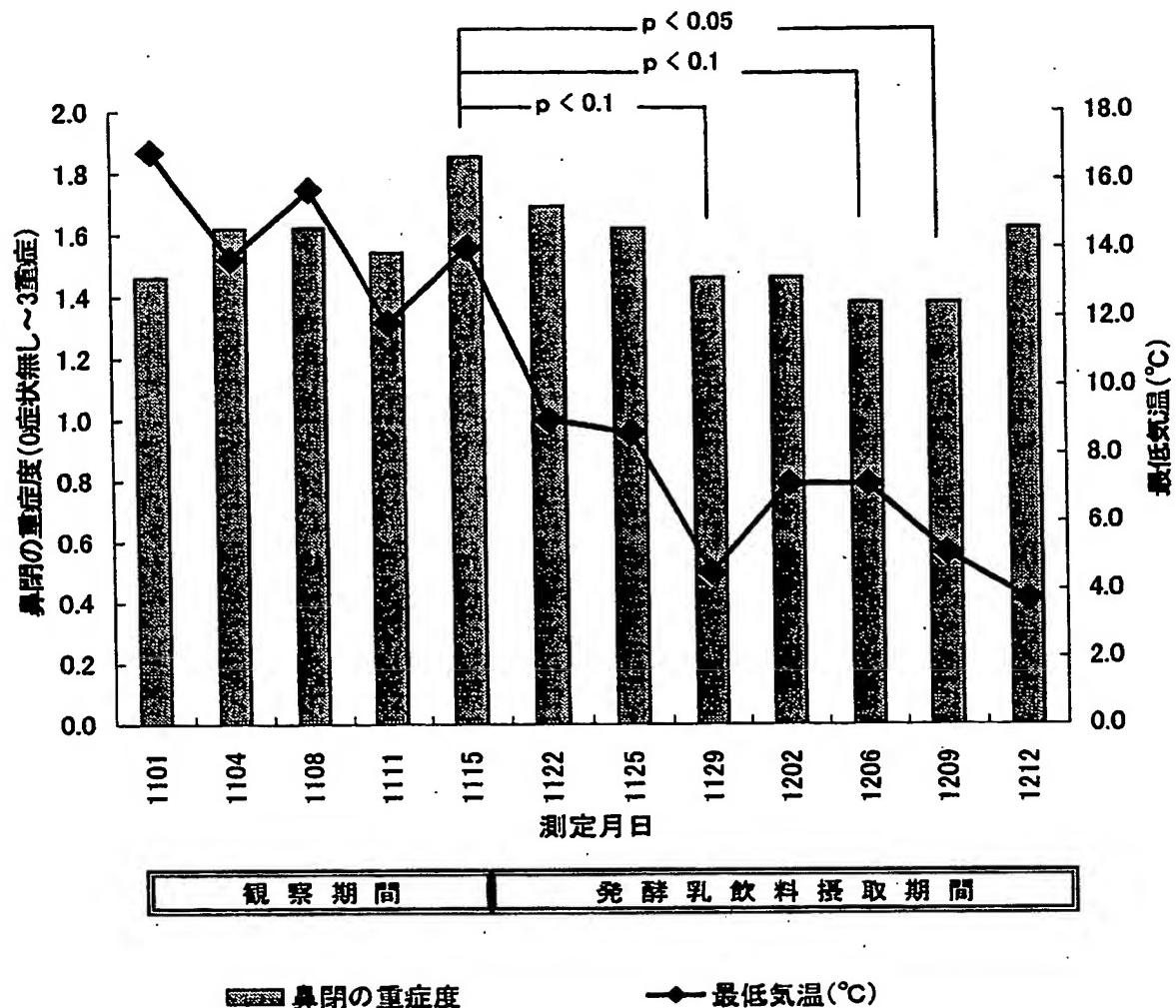
[图3]



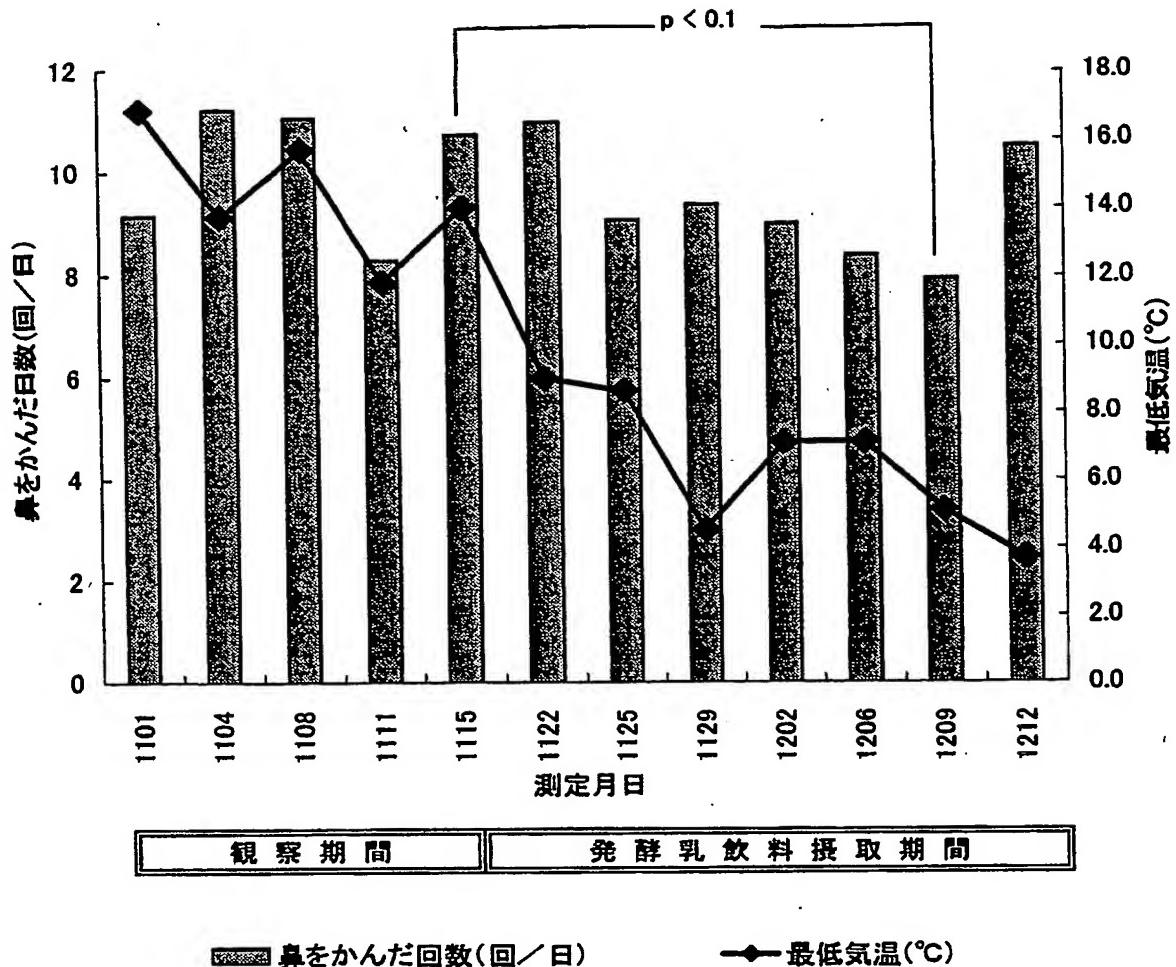
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 I型アレルギーの発症に関わるIgE抗体量を減少させてアレルギー体質を改善することができ、容易に摂取でき、かつ安全性が高い抗アレルギー剤を提供する。

【解決手段】 ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) に属する乳酸菌、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) に属する乳酸菌、及びこれらの組み合わせからなる群より選択される乳酸菌を有効成分として含む抗アレルギー剤。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
 【整理番号】 P02-144
 【提出日】 平成15年 6月 5日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-185897
 【補正をする者】
 【識別番号】 000104353
 【氏名又は名称】 カルピス株式会社
 【代理人】
 【識別番号】 100081514
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 酒井 一
 【手続補正 1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 発明者
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピス
 株式会社基盤技術研究所内
 【氏名】 山本 直之
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピス
 株式会社基盤技術研究所内
 【氏名】 石田 優
 【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺5丁目11番10号 カルピス
 株式会社基盤技術研究所内

【氏名】 板東 出樹

【その他】 発明者の一人「板東 出樹」を「坂東 出樹」と誤記しましたので、ここに訂正をお願い致します。

【プルーフの要否】 要

出願人履歴情報

識別番号 [000104353]

1. 変更年月日 1997年 9月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号

氏 名 カルピス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.